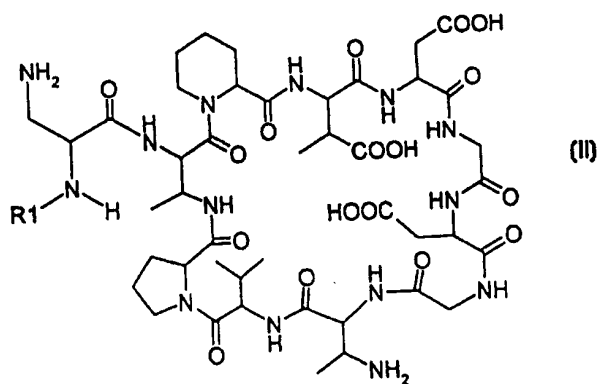




PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 7/60, A61K 38/12		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/43700
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	2. September 1999 (02.09.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00930		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 1999 (12.02.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 07 972.9 25. Februar 1998 (25.02.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brünigstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VÉRTESY, Laszló [DE/DE]; Eppenhainer Weg 6, D-65817 Eppstein (DE). ARETZ, Werner [DE/DE]; Am Wäldchen 13, D-61462 Königstein (DE). DECKER, Heinrich [DE/DE]; Hessenring 86, D-65817 Brental (DE). EHLERS, Eberhard [DE/DE]; Lorschbacher Strasse 54b, D-65719 Hofheim (DE). KURZ, Michael [DE/DE]; Erlenweg 7, D-65719 Hofheim (DE). SCHMIDT, Frank, Rainer [DE/DE]; Am Kreishaus 6a, D-65719 Hofheim (DE).			

(54) Title: **CALCIUM SALTS OF LIPOPEPTIDE ANTIBIOTICS, METHOD FOR PRODUCING SAME AND THEIR USE**
(54) Bezeichnung: **LIPOPEPTIDANTIBIOTIKA-CALCIUMSALZE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**



(57) Abstract

The invention relates to a calcium salt of the compound of formula (II), where R1 is a straight-chain or branched, saturated or unsaturated aliphatic acyl rest with between 8 and 22 carbon atoms, which can optionally be interrupted by or linked to one or more phenyl or cycloalkyl groups and optionally interrupted by oxygen. The invention also relates to a method for producing said calcium salt and to its use as a medicine.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Calciumsalz der Verbindung der Formel (II), worin R1 ein geradkettiger oder verzweigter, gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Acylrest mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen bedeutet, der wahlweise durch ein oder mehrere Phenyl- oder Cycloalkylgruppen unterbrochen oder mit solchen Gruppen verknüpft und ferner wahlweise durch Sauerstoff unterbrochen sein kann, ein Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung als Arzneimittel.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

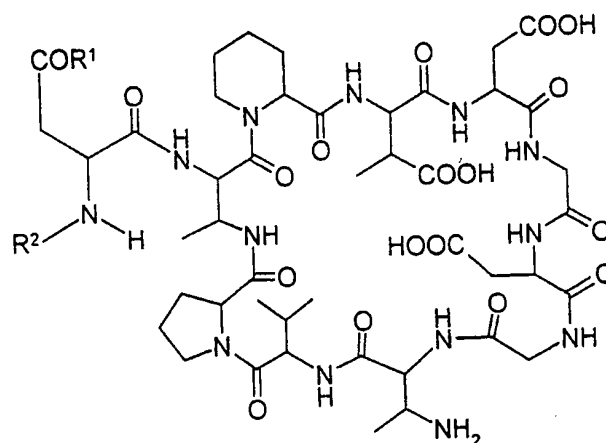
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Beschreibung

Lipopeptidantibiotika-Calciumsalze, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung.

Die vorliegende Erfindung betrifft Calciumsalze von Lipopeptidantibiotika, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Aus der EP 0 629 636 A1 sind Lipopeptidantibiotika der allgemeinen Formel I bekannt, in der R¹ eine OH- oder eine NH₂-Gruppe und R² einen Fettsäurerest (R-C(O)-) bedeuten.



Diese Lipopeptidantibiotika lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, welche sich in bezug auf ihre exozyklische Aminosäure unterscheiden: Die Lipopeptidantibiotika vom Amphomycin-Typ sind durch die exozyklische Aminosäure Asparaginsäure (Asp, wobei R¹ in Formel I eine OH-Gruppe bedeutet) gekennzeichnet (R. C. Strong et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1970, 42-45; M. Bodanszky et al. J. Am. Chem. Soc. 95, 2352-2357 (1973)), während sich die Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ durch die exozyklische Aminosäure Asparagin (Asn, wobei R¹ in Formel I eine NH₂-Gruppe bedeutet) auszeichnen. Untereinander unterscheiden sich die Lipopeptidantibiotika vom Amphomycin- und vom Asparagin-Typ durch Substitution an

der α -Aminogruppe der exozyklischen Aminosäure (Asp oder Asn) mit unterschiedlichen Fettsäureresten (R^2 in Formel I).

Ferner sind aus der EP 0 688 789 A1 (US 5,629,288) Derivate der Lipopeptidantibiotika vom Amphomycin- und vom Asparagin-Typ und deren pharmazeutisch verträgliche Salze bekannt. Als pharmazeutisch verträgliche Salze der Lipopeptidantibiotika der Formel I werden in der EP 0 688 789 A1 (US 5,629,288) Salze mit anorganischen und organischen Säuren, z.B. Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Citronensäure, p-Toluolsulfonsäure, mit anorganischen und organischen Basen wie NaOH, KOH, $Mg(OH)_2$, Diethanolamin, Ethylendiamin oder mit Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Glutaminsäure offenbart.

Ferner ist das Calciumsalz von Amphomycin bekannt (Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, vierte Auflage, Band 3, Antibiotics to Batteries, John Wiley & Sons, Seite 284). Es ist in Wasser nur schwer löslich und wurde wegen der Toxizität von Amphomycin infolge dessen hämolytischen Aktivität bei systemischer Anwendung ausschließlich in antibiotischen Salben zur lokalen Applikation verwendet.

Die Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ (R^1 in Formel I bedeutet eine NH_2 -Gruppe) und deren Herstellung sind erstmals in der EP 0 629 636 A1 beschrieben worden. Das dort vorgeschlagene Herstellungsverfahren, die Fermentation von *Actinoplanes* sp., vorzugsweise *Actinoplanes friulensis* (am 18. Juni 1990 gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags unter der Hinterlegungsnummer DSM 7358 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig hinterlegt), führt jedoch zu einem Gemisch einer Vielzahl der strukturell nahe verwandten Lipopeptide vom Amphomycin- und vom Asparagin-Typ, die sehr unterschiedliche Eigenschaften, insbesondere unterschiedliche biologische Wirkungen, wie zum Beispiel deren antibakterielle Wirkung, Toxizität infolge deren hämolytischen Wirkung, sowie unterschiedliche physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel deren Löslichkeit und

Stabilität, aufweisen, aber aus dem Kulturmedium nur aufwendig getrennt werden können. Es wäre deshalb von großem Vorteil, über ein Fermentationsverfahren zu verfügen, welches im wesentlichen zur Produktion bevorzugt nur einer der vielen möglichen Lipopeptid-Komponenten führt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Salz der Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ bereitzustellen, welches sich durch eine relativ hohe Stabilität sowie gute antibakterielle Wirksamkeit auszeichnet und infolge seiner guten Wasserlöslichkeit sowie infolge seiner geringen Toxizität, insbesondere aufgrund einer geringen hämolytischen Aktivität, systemisch (parenteral) anwendbar ist.

Ferner ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines Salzes der Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ bereitzustellen und im besonderen ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung dessen Säurevorstufe, bei dem bevorzugt Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ erzeugt werden, bereitzustellen.

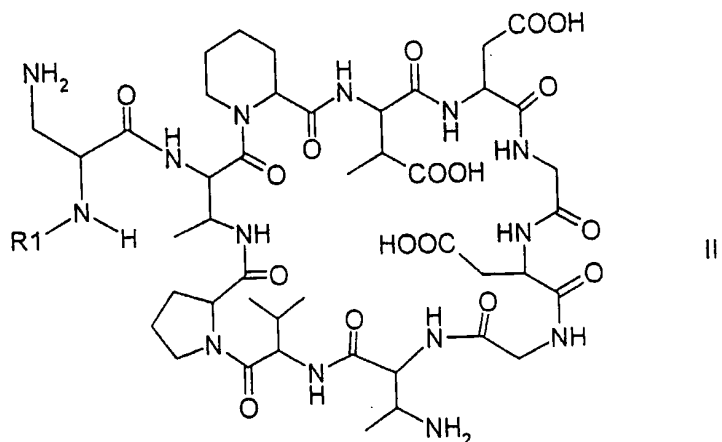
Schließlich ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Arzneimittel bereitzustellen, das ein Salz der Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ mit den gewünschten vorteilhaften Eigenschaften enthält.

Es wurde nun bei den Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ gefunden, daß die verschiedenen Salze desselben Lipopeptids (bzw. derselben korrespondierenden Säure) sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können. Beispielsweise besitzen die Natriumsalze in der Regel eine sehr gute antibakterielle Wirksamkeit und sind in Wasser leicht löslich. Diese sind jedoch insbesondere bei erhöhten Temperaturen nur begrenzt haltbar. Da bei Medikamenten und anderen Handelsprodukten eine Stabilität z. B. für die Handhabung der Ware von großer Wichtigkeit ist, sind stabile Salz-Formen der Lipopeptidantibiotika erforderlich.

Da die Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ amphotäre Verbindungen mit einem isoelektrischen Punkt im sauren Bereich sind, lassen sich neutrale Salze mit zahlreichen Basen herstellen. Als Kationen kommen einwertige und mehrwertige Ionen in Frage, wie zum Beispiel Alkali-, Erdalkali-, und andere Metallionen aber auch Salze mit Ammoniak oder mit organischen Basen, wie Aminen. Als Beispiel für letztere dienen Lysin- und Lysyllysin-Salze, die bei voller Wirksamkeit sehr gut verträglich sind.

Überraschend ist nun gefunden worden, daß im Gegensatz zu den Calciumsalzen der Lipopeptidantibiotika vom Amphomycin-Typ (insbesondere Amphomycin[®]) die Calcium-Salze der Lipopeptidantibiotika vom Asparagin-Typ nicht nur wirksam und verträglich, sondern auch in Wasser gut löslich und im Gegensatz zu den entsprechenden Natriumsalzen besonders beständig sind.

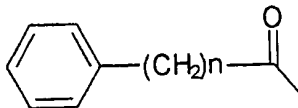
Dementsprechend wird die vorstehend gestellte Aufgabe gelöst durch ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II



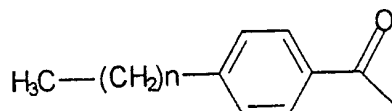
worin R1 ein geradkettiger oder verzweigter, gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Acylrest mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen bedeutet, der wahlweise durch ein oder mehrere Phenyl- oder Cycloalkylgruppen unterbrochen oder mit solchen Gruppen verknüpft und ferner wahlweise durch Sauerstoff unterbrochen sein kann.

Vorzugsweise bedeutet R1 in Formel II ein durch eine Phenyl- oder Cycloalkylgruppe unterbrochener oder mit einer solchen Gruppe verknüpfter Acylrest, beispielsweise

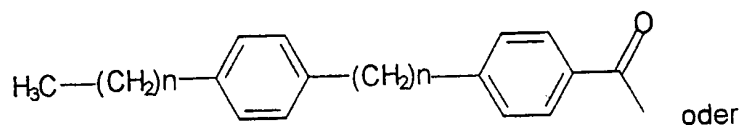
(1a)



(1b)

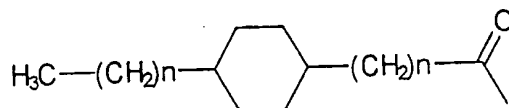


(1c)



oder

(1d)



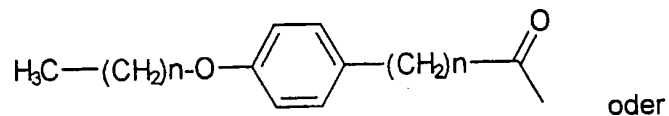
, wobei n eine

ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

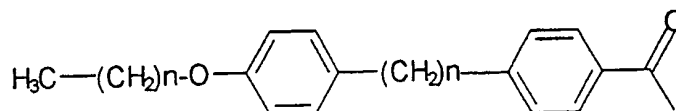
Ferner bevorzugt ist ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II, das sich dadurch auszeichnet, daß R1 ein durch eine Phenyl- oder Cycloalkylgruppe und durch Sauerstoff unterbrochener Acylrest bedeutet, vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß R1

6

(2a)



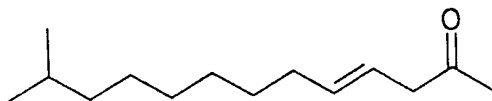
(2b)



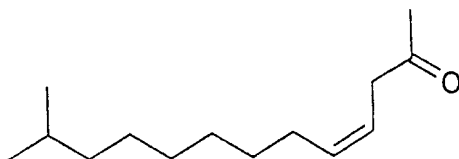
bedeutet, wobei n eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

Besonders bevorzugt ist ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II, welches sich dadurch auszeichnet, daß R1 ein geradkettiger oder verzweigter, gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Acylrest mit 12 bis 15 Kohlenstoffatomen bedeutet, wobei R1 in Formel II vorzugsweise ein Fettsäurerest der nachfolgend dargestellten Formeln bedeutet:

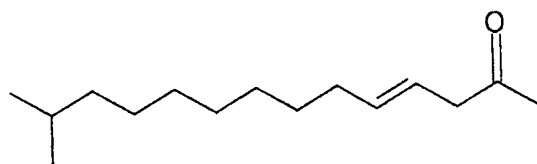
(3a)



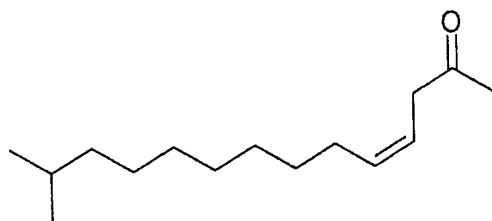
(3b)



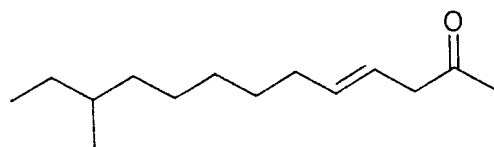
(3c)



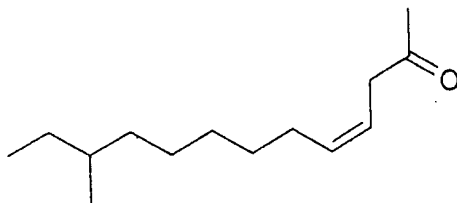
(3d)



(3e)

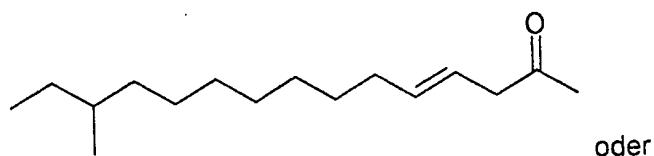


(3f)

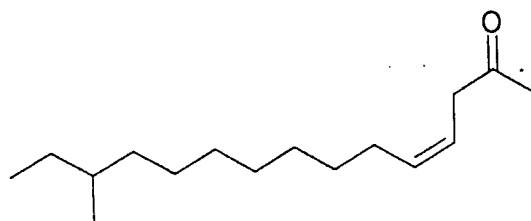


8

(3g)



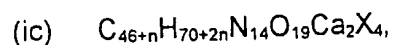
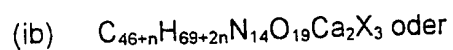
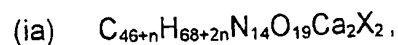
(3h)



Das Calciumsalz der Verbindung der Formel II kann in zwei Formen vorliegen, als Dicalciumsalz oder als Monocalciumsalz.

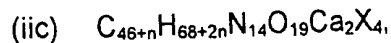
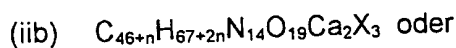
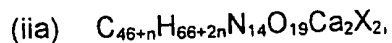
Das Dicalciumsalz kann in Abhängigkeit von der Zahl der Anionen und dem Fettsäuresubstituenten (R1 in Formel II)

(i) beispielsweise im Fall einer gesättigten Fettsäure (R1 in Formel II) durch die allgemeine Summenformel



wobei in der allgemeinen Summenformel n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten, oder

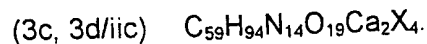
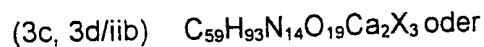
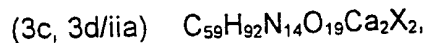
(ii) beispielsweise im Fall einer einfach ungesättigten Fettsäure (R1 in Formel II) durch die allgemeine Summenformel



wobei in der allgemeinen Summenformel n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten,

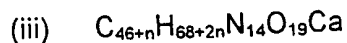
näher beschrieben werden.

Beispielsweise können die vorstehend erwähnten, bevorzugten Calciumsalze der Verbindung der Formel II (3c) und (3d) bei Vorliegen eines Dicalciumsalzes durch die folgenden Summenformeln näher beschrieben werden, wobei in den Summenformeln X für ein Anion steht:

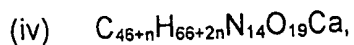


Vorzugsweise ist in sämtlichen, vorstehend genannten Summenformeln das Anion X ein Halogenidanion, Cl^- , Br^- oder I^- , besonders bevorzugt Cl^- .

Das Monocalciumsalz kann in Abhängigkeit von dem Fettsäuresubstituenten (R1 in Formel II) ferner beispielsweise im Fall einer gesättigten Fettsäure (R1 in Formel II) durch die allgemeine Summenformel

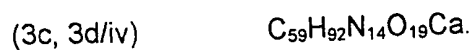


oder beispielsweise im Fall einer einfach ungesättigten Fettsäure (R1 in Formel II) durch die allgemeine Summenformel



wobei n in beiden allgemeinen Summenformeln eine ganze Zahl von 7 bis 21 bedeutet, näher charakterisiert werden.

Beispielsweise können die vorstehend erwähnten, bevorzugten Calciumsalze der Verbindung der Formel II (3c) und (3d) bei Vorliegen eines Monocalciumsalzes durch die folgende Summenformel näher beschrieben werden:



Bei den vorstehend erwähnten, bevorzugten Calciumsalzen der Verbindung der allgemeinen Formel II (3c) und (3d) weist demgegenüber die korrespondierende Säure, nämlich die entsprechende Verbindung der Formel II, beispielsweise die Summenformel $C_{59}H_{94}N_{14}O_{19}$ auf.

Die im folgenden A 1437-D genannte, zum vorstehend erwähnten, bevorzugten Calciumsalz (3d) korrespondierende Säure (die entsprechende Verbindung der allgemeinen Formel II) weist die nachfolgend dargestellte Struktur auf (Fig. 1):

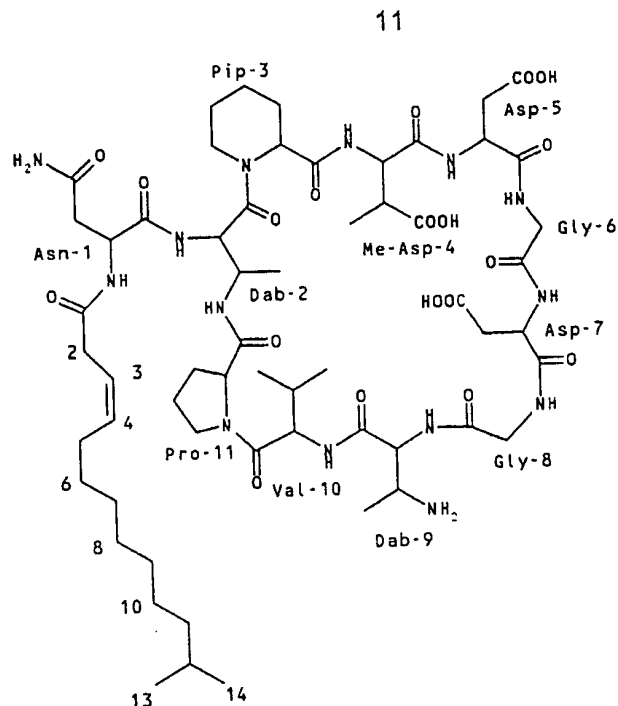


Fig. 1: Strukturformel von A 1437-D (Säureform von 3d)

In Tabelle 1 ist die Zuordnung der ^1H und ^{13}C -NMR-Signale am Beispiel des A 1437 D Natriumsalzes aufgeführt. Die Aminosäure-Bezeichnungen sind entsprechend den internationalen Konventionen abgekürzt, Dab = 2,3-Diaminobuttersäure, Me-Asp = β -Methylasparaginsäure, Pip = Pípecolinsäure, FA = Fettsäure. Die Aminosäuren weisen vorzugsweise die folgende Konfiguration auf: Pip-3: D; Me-Asp-4: L-threo; Asp-5, -7: L; Dab-2: L-threo; Dab-9: D-erythro; Val-10: L; Pro-11: L; Asn-1: L.

Tabelle 1: Chemische Verschiebungen von A 1437-D in CD₃CN/H₂O bei 285 K^{a)}.

AS	Proton/Kohlenstoff	¹ H	¹³ C
Asn ¹	NH	7.82	-
	α	4.69	53.36
	β	2.70/2.64	39.42
	C'	-	174.59
	β-C'	-	176.23
	NH ₂	7.36/6.76	-
Dab ²	NH	7.77	-
	α	5.04	56.49
	β	4.50	48.88
	γ	1.05	20.76
	β-NH	7.59	-
	C'	-	172.56
Pip ³	α	4.64	57.39
	β	2.23/1.68	28.86
	γ	1.64/1.29	22.56
	δ	1.76/1.70	26.30
	ε	3.82/3.36	46.41
	C'	-	175.34
Me-Asp ⁴	NH	8.93	-
	α	4.56	58.07
	β	2.51	50.6(breit)
	γ	1.05	17.24
	C'	-	176.65
	β-C'	-	184.13
Asp ⁵	NH	8.24	-

	α	4.19	57.09
	β	2.58/2.50	40.47
	C'	-	177.34
	β -C'	-	179.15
Gly ⁶	NH	8.83	-
	α	4.23/3.67	45.32
	C'	-	174.48
Asp ⁷	NH	7.68	-
	α	4.57	53.85
	β	3.18/2.44	41.93
	C'	-	176.17
	β -C'	-	179.21
Gly ⁸	NH	8.10	-
	α	4.29/3.55	173.23
	C'	-	173.23
Dab ⁹	NH	9.54(breit)	-
	α	4.43	59.41
	β	3.54	53.45
	γ	1.34	19.78
	C'	-	172.45
Val ¹⁰	NH	8.31	-
	α	4.02	62.58
	β	2.25	32.20
	γ	1.05	20.72
	γ'	0.94	21.39
	C'	-	175.42
Pro ¹¹	α	4.06	63.97
	β	2.20/1.74	32.50

	γ	1.99/1.91	27.91
	δ	3.83/3.55	50.93
	C'	-	173.57
FA	1	-	175.52
	2	3.03	36.84
	3	5.51	124.41
	4	5.61	136.65
	5	2.05	29.82
	6	1.35	32.40 ^{b)}
	7	1.25-1.35	32.14 ^{b)}
	8	1.25-1.35	31.97 ^{b)}
	9	1.25-1.35	31.83 ^{b)}
	10	1.29	29.96
	11	1.17	41.54
	12	1.53	30.51
	13,14	0.88	24.77

a) Geeicht wurde auf Natrium-3-(Trimethylsilyl)propionat-2,2,3,3-d₄.

Es konnte nun beobachtet werden, daß beispielsweise beim Übergang vom A-1437-D-Natriumsalz zum Calciumsalz (3d) die physikochemischen Eigenschaften des Antibiotikums sich grundlegend ändern. So steigt spezifische Drehung $[\alpha]$ des Natriumsalzes bei der Wellenlänge der Natrium-D-Linie und bei 20° C von +6° auf über +52° an, wenn man zu der wässrigen Lösung ein lösliches Calciumsalz, wie z. B. CaCl₂ hinzufügt. Dieses ungewöhnliche Verhalten legt die Annahme nahe, daß das Molekül eine wesentliche Änderung seiner Konformation erfährt. Unterstützt wird diese Konformationsänderung auch durch die geringe Leitfähigkeit des A-1437-D-Calciumsalzes (3d/iv), welche deutlich niedriger ist, als für eine ionogene Verbindung zu erwarten wäre.

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Herstellung von Calciumsalzen der Verbindung der Formel II. Zum einen kann man die begrenzte Löslichkeit der Calciumsalze in ausgewählten Lösungen nutzbar machen. Während die Na^+ - oder die NH_4^+ -Salze in Wasser oder in Methanol sehr leicht löslich und in höheren Alkoholen und anderen polaren organischen Lösungsmitteln löslich sind, sind Löslichkeiten der entsprechenden Calciumsalze in nicht wäßrigen Lösemitteln deutlich herabgesetzt.

Demnach zeichnet sich das Verfahren zur Herstellung des vorstehend beschriebenen Calciumsalzes der Verbindung der Formel II dadurch aus, daß man ein Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II in einem geeigneten organischen Lösungsmittel löst, zu dieser Lösung ein in Ethanol gelöstes Calciumsalz hinzufügt und das Calciumsalz der Verbindung der Formel II als Niederschlag isoliert. Vorzugsweise ist das geeignete organische Lösungsmittel Ethanol. Das in Ethanol gelöste, hinzuzufügende Calciumsalz ist vorzugsweise ein Calciumhalogenid, CaCl_2 , CaBr_2 , CaI_2 oder die entsprechenden Hydrate. Bei diesem Verfahren entstehen bevorzugt die Dicalciumsalze der Verbindung der Formel II.

Zur Herstellung beispielsweise der Calciumsalze (3d/ia) mit der Summenformel $\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{X}_2$, (3d/ib) mit der Summenformel $\text{C}_{59}\text{H}_{93}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{X}_3$ oder (3d/ic) mit der Summenformel $\text{C}_{59}\text{H}_{94}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{X}_4$ kann man deshalb so verfahren, daß man das Natrium- oder Ammonium-Salz von A 1437 D (die zu (3d) korrespondierende Säure) in einem geeigneten organischen Lösemittel, wie z. B. Ethanol löst und zu dieser Lösung ein in Ethanol gelöstes Calciumsalz hinzufügt. Hierbei fällt das im organischen Lösemittel wenig lösliche A 1437 D-Calciumsalz in Form eines Niederschlages aus. Für die Fällung geeignete, in Ethanol lösliche Calciumsalze sind zum Beispiel CaCl_2 , CaBr_2 , CaI_2 sowie ihre Hydrate. Dieses Fällungsverfahren führt zu Salzen, die neben dem Calciumkation noch Anionen des Fällungssalzes enthalten können, beispielsweise die Halogenide Cl^- , Br^- und I^- . Die Summenformeln der gefällten Calciumsalze können zum Beispiel lauten: $\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{Halogenid}_2$, wie z. B. $\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{Cl}_2$ oder

$C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca_2I_2$ oder $C_{59}H_{93}N_{14}O_{19}Ca_2Halogenid_3$ wie z. B. $C_{59}H_{93}N_{14}O_{19}Ca_2Br_3$ oder $C_{59}H_{93}N_{14}O_{19}Ca_2Cl_3$, es können aber auch, je nach Fällungsbedingung, andere Mischsalze entstehen, für die u. a. die Zusammensetzung $C_{59}H_{94}N_{14}O_{19}Ca_2Halogenid_4$ gefunden wird. Diese gemischten Salze (A 1437 Calcium-Mischsalze) sind in Wasser löslich und eignen sich daher zur Behandlung von bakteriellen Infektionen oder zur Konservierung oder auch zur Wachstumsförderung in der Tierzucht, sie können aber auch als Zwischenprodukte für die Herstellung anderer Salze dienen.

Die Kristallisation ist eine weitere Möglichkeit, Calciumsalze der Verbindung der Formel II zu gewinnen oder zu reinigen. Hierbei wird die Eigenschaft des Antibiotikum-Calciumsalzes genutzt, sich in reinem Wasser, in Dimethylsulfoxyd, in reinem Methanol und in anderen polaren Lösungsmitteln zu lösen.

Demgemäß zeichnet sich das Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes, vorzugsweise des Monocalciumsalzes, der Verbindung der Formel II dadurch aus, daß man ein Dicalciumsalz der Verbindung der Formel II, welches beispielsweise nach der vorstehend beschriebenen Methode gewonnen werden kann, in einem polaren Lösungsmittel löst, anschließend die erhaltene Lösung mit einem weniger polaren Lösungsmittel oder einer Mischung aus weniger polaren Lösungsmitteln versetzt und das Calciumsalz, vorzugsweise das Monocalciumsalz, als Niederschlag isoliert.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes, vorzugsweise des Monocalciumsalzes, der Verbindung der Formel II zeichnet sich dadurch aus, daß man ein Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II in einem polaren Lösungsmittel löst, zu dieser Lösung ein in demselben Lösungsmittel gelöstes Calciumsalz hinzufügt, anschließend die erhaltene Lösung mit einem weniger polaren Lösungsmittel oder einer weniger polaren Lösungsmittelmischung versetzt und das Calciumsalz, vorzugsweise das Monocalciumsalz, als Niederschlag isoliert.

Vorzugsweise wird bei den beiden Verfahrensalternativen das Natrium- oder Ammoniumsalz oder das Dicalciumsalz der Verbindung der Formel II in einem polaren Lösungsmittel gelöst, das ausgewählt ist aus der Gruppe Wasser, Dimethylsulfoxid und Methanol.

Vorzugsweise ist das weniger polare Lösungsmittel, mit dem die erhaltene Lösung versetzt wird, ausgewählt aus der Gruppe Alkohole, Aceton und Acetonitril.

Vorzugsweise wird das Natrium- oder Ammoniumsalz oder das Dicalciumsalz der Verbindung der Formel II in Wasser gelöst, und das weniger polare Lösungsmittel ist Methanol.

Vorteilhafterweise wird bei beiden Verfahrensvarianten als weniger polare Lösungsmittelmischung ein Gemisch aus Methanol und Butanol zugesetzt.

Wahlweise kann das Calciumsalz, vorzugsweise das Monocalciumsalz, der Verbindung der Formel II dadurch hergestellt werden, daß man ein Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II in Methanol löst, zu dieser Lösung ein in demselben Lösungsmittel gelöstes Calciumsalz hinzufügt, anschließend die erhaltene Lösung mit Wasser oder einer Mischung aus Wasser und Butanol versetzt und das Calciumsalz, vorzugsweise das Monocalciumsalz, als Niederschlag isoliert.

Vorzugsweise fügt man bei sämtlichen dieser Verfahrensvarianten als gelöstes Calciumsalz vorzugsweise ein Calciumhalogenid hinzu, welches ausgewählt ist aus der Gruppe CaCl_2 , CaBr_2 , CaI_2 und deren Hydrate.

Beispielsweise kann man das A 1437-D-Dicalciumsalz konzentriert in einem gut lösendem Lösungsmittel lösen und anschließend mit einem mischbaren aber das Antibiotikasalz weniger lösenden Mittel versetzen. Beispiele für letztere sind weniger polare, organische Lösungsmittel, wie Alkohole, Aceton, Acetonitril und weitere. Einen

Sonderfall bildet die Mischung aus Wasser und Methanol. Während diese reinen Lösemittel A 1437-D-Ca-Salze leicht lösen, haben die Mischungen aus beiden Lösungsmitteln deutlich schwächere Lösungseigenschaften. Man kann also die A 1437-D-Monocalciumsalze (3d/iv) aus Wasser (aus Methanol) mit Methanol- (Wasser-) Zugabe fällen und kristallisieren. Auf dieser Weise lassen sich Calciumsalze herstellen oder reinigen. Das A 1437-D-Monocalciumsalz (3d/iv) bildet in Wasser-Methanol-Gemischen leicht Gele. Diese Gelbildung ist für die Kristallisation ungünstig, weil dadurch die Kristallisationsgeschwindigkeit stark verlangsamt wird. Für die Kristallisation müssen deshalb Maßnahmen ergriffen werden, um die Gelbildung zu unterdrücken. So eine Maßnahme kann z. B. die Zugabe von geringen Mengen eines geeigneten Stoffes, wie beispielsweise Butanol sein.

Ein anderes Verfahren zur Herstellung des Calciumsalzes der Verbindung der Formel II, vorzugsweise dessen Monocalciumsalzes, beispielsweise das A 1437-D-Monocalciumsalz (3d/iv), besteht in der Verwendung eines Trägers, zum Beispiel von Adsorptionsharzen, Umkehrphasenträgern, Molekularsieben und Ionenaustauschern, welcher mit einer wässrigen Lösung eines Natrium- oder Ammoniumsalzes der Verbindung der Formel II (beispielsweise das Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung A 1437-D), die mit einem Calciumhalogenid versetzt wurde, oder wahlweise mit einer wässrigen Lösung eines Dicalciumsalzes der Verbindung der Formel II (beispielsweise die Dicalciumsalze (3d/iiia), (3d/iiib) oder (3d/iic)) beladen wird, wonach der Träger optional mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen und schließlich das Calciumsalz der Verbindung der Formel II, vorzugsweise das Monocalciumsalz, beispielsweise das A 1437-D-Monocalciumsalz (3d/iv), mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert wird.

Zur Verwendung als Adsorptionsharze sind beispielsweise Amberlite XAD 7 (Rohm & Haas), DIAION® HP20SS (Mitsubishi Chem. Corp.), Poros™ 20 R2 oder Polyamid 6 (Riedel-deHaen), bei Verwendung von Umkehrphasen-Trägern sind zum Beispiel LiChrosorb® RP-select B (E. Merck) geeignet. Es können aber auch Träger eingesetzt

werden, die gewöhnlich im Rahmen der Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) zum Beispiel für die Proteinreinigung verwendet werden. Solche Träger sind zum Beispiel Phenyl Sepharose[®] oder TSKgel Phenyl Toyopearl[®]. Darüber hinaus eignen sich auch Molekularsiebe wie sie für die "size exclusion chromatography" oder Gelfiltrations-Chromatography verwendet werden. Die Grundlage von diesem Verfahren ist die Neigung der Verbindung der Formel II (beispielsweise A1437-D), Calcium-Ionen zu binden. Bei der Verwendung von den genannten Trägern wird eine Mischung von Ammonium- oder Natriumsalzen der Verbindung der Formel II mit Calciumsalzen in Wasser hergestellt und diese Mischung in an sich bekannter Weise an den Trägern getrennt. Wahlweise kann auch eine wäßrige Lösung eines entsprechenden Dicalciumsalzes vorgelegt werden. Beispielsweise wird eine wäßrige Lösung von A1437-D-Natriumsalz und Calciumchlorid auf ein Adsorptionsharz, wie zum Beispiel auf DIAION[®] HP 20SS aufgetragen, das beladene Harz mit Wasser gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen, und anschließend wird das Calciumsalz des Lipopeptids mit wasserhaltigen oder wasserfreien Lösungsmitteln, vorzugsweise mit Methanol von dem Träger eluiert. Die A1437-Calcium-haltigen Fraktionen werden getrocknet. Ein so gewonnenes Produkt hat beispielsweise die Elementarzusammensetzung $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$ (Monocalciumsalz der Verbindung der Formel II (3d/iv)).

Ferner können zur Gewinnung von Calciumsalzen der Verbindung der Formel II Ionenaustauscher, vorzugsweise Anionenaustauscher eingesetzt werden. Bei dieser Methode wird beispielsweise eine beliebige wäßrige, ionenarme Lösung der Verbindung der Formel II bei pH-Werten zwischen pH 5 und pH 9 an einen Anionenaustauscher gebunden, und nach dem Waschen des beladenen Trägers mit Wasser wird das Monocalciumsalz der Verbindung der Formel II mit einer steigenden Konzentration eines in Wasser löslichen Calciumsalzes eluiert. Das Säuleneluat, welches das Monocalciumsalz enthält, wird zum Beispiel durch reverse Osmose entsalzt und getrocknet. Wahlweise kann das Monocalciumsalz durch andere Verfahren, wie z.B. durch Kristallisation isoliert werden.

Die Verbindungen der Formel II, die Vorstufen der erfindungsgemäßen Calciumsalze, lassen sich vorteilhafterweise, wie aus der EP 0 629 636 A1 bekannt, durch Fermentation von *Actinoplanes* sp., vorzugsweise *Actinoplanes friulensis* (DSM 7358), herstellen und wahlweise, wie in der EP 0 688 789 A1 (US 5,629,288) beschrieben, durch Austausch des Säurerestes R1 in Formel II durch einen nicht natürlich vorkommenden Säurerest derivatisieren. Die so gewonnenen Verbindungen der Formel II lassen sich wie vorstehend beschrieben zu deren Calciumsalzen umsetzen.

Die eingangs gestellte Aufgabe, ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung der Verbindung der Formel II, der Säurevorstufe der erfindungsgemäßen Calciumsalze, bereitzustellen, bei dem von dem Mikroorganismus bevorzugt die Verbindung der Formel II produziert wird, wird dadurch gelöst, daß man bei der Fermentation von *Actinoplanes spec.*, vorzugsweise von *Actinoplanes friulensis* DSM 7358, die Fermentationslösung mit einem oder mehreren Komplexbildnern, vorzugsweise Chelatbildnern, und mit der Aminosäure Asparagin supplementiert.

Vorzugsweise wird als Komplexbildner Zitronensäure oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet.

Vorteilhafterweise kann auch die Fermentationslösung mit EDTA und Zitronensäure supplementiert werden.

Zur Erhöhung der Ausbeute einer Verbindung der Formel II, bei welcher R beispielsweise ein Fettsäurerest der Formel (3a) oder vorzugsweise (3b) ist, kann die Fermentationslösung zusätzlich mit der Aminosäure L-Leucin supplementiert werden.

Zur Erhöhung der Ausbeute an einer Verbindung der Formel II, bei welcher R1 beispielsweise ein Fettsäurerest der Formeln (3c) oder vorzugsweise (3d) bedeutet,

kann die Fermentationslösung zusätzlich mit der Aminosäure L-Valin supplementiert werden.

Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes der Verbindung der Formel II, das sich dadurch auszeichnet, daß man in einem ersten Schritt die Verbindung der Formel II, wie vorstehend beschrieben, durch Fermentation von *Actinoplanes spec.*, vorzugsweise *Actinoplanes friulensis* (DSM 7358), herstellt, wobei man die Fermentationslösung mit einem oder mehreren Komplexbildnern, vorzugsweise Chelatbildnern, und mit der Aminosäure Asparagin supplementiert, und man in einem nachfolgenden Schritt das Calciumsalz der Verbindung der Formel II, wie vorstehend erläutert, durch Fällung, Kristallisation oder Behandlung an einem Träger gewinnt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II zur Verwendung als Arzneimittel.

Die Calciumsalze der Verbindung der Formel II eignen sich vorzugsweise zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen, wobei die vorstehend beschriebenen Calciumsalze (3c) und insbesondere (3d) oder die Dicalciumsalze (3c/IIa), (3c/IIb) sowie (3c/IIc) und insbesondere die Dicalciumsalze (3d/IIa), (3d/IIb) oder (3d/IIc) besonders geeignet sind, wobei das Dicalciumsalz (3d/IIa) besonders bevorzugt ist. Besonders eignen sich auch die Monocalciumsalze der Verbindung der Formel II zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen, wobei die Monocalciumsalze (3c) und insbesondere (3d) mit der Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$ bevorzugt sind. Vorzugsweise eignen sich die vorstehend genannten Calciumsalze der Verbindung der Formel II zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen, die von gram-positiven Bakterien, vorzugsweise von glycopeptidresistenten Bakterien, hervorgerufen werden.

Die wenigstens ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II enthaltenden Arzneimittel können ferner die üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffe enthalten.

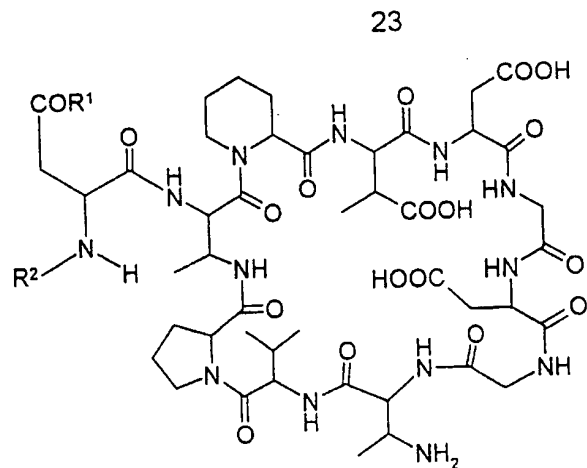
Beispielsweise kann das Dicalciumsalz der Verbindung der Formel II, vorzugsweise das Chlorid 3d/IIa, zur Herstellung eines Arzneimittels mit gleichen Gewichtsanteilen Mannit in Wasser gelöst und anschließend lyophilisiert werden.

Besonders geeignet sind die Calciumsalze der Verbindung der Formel II aufgrund ihrer Löslichkeit und ihrer toxikologischen Eigenschaften zur parenteralen Verabreichung in Form einer injizierbaren Lösung. Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch injizierbare Lösungen, enthaltend ein oder mehrere Calciumsalze der Verbindung der Formel II, vorzugsweise das Calciumsalz (3d/IV) mit der Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$ oder besonders bevorzugt das Calciumsalz 3d/IIa mit der Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca_2Cl_2$.

Zur Herstellung einer Injektionslösung kann das aus zu gleichen Gewichtsanteilen an Mannit und Calciumsalz bestehende Lyophilisat in entsprechend aufbereitetem Wasser gelöst werden.

Beispiele

In den nachfolgenden Beispielen wird die Säureform der Verbindungen der Formel I mit A1437 bezeichnet. Figur 2 gibt eine Übersicht über die in den Beispielen hergestellten bzw. eingesetzten Lipopeptide. Die mit A1437-A, -B und -G bezeichneten Verbindungen der Formel I gehören zu den Lipopeptiden vom Amphomycin-Typ ($R^1 = OH$ in Formel I), die mit A1437-C, -D und -H bezeichneten Verbindungen gehören zu den Lipopeptiden vom Asparagin-Typ ($R^1 = NH_2$ in Formel I) bzw. sind Verbindungen der allgemeinen Formel II.



R² =	R¹ = OH	R¹ = NH₂
	A1437-A	A1437-C
R² =	A1437-B	A1437-D
	A1437-G	A1437-H

Fig. 2

Wie aus der EP 0 629 636 bekannt, bildet *Actinoplanes spec.*, insbesondere *Actinoplanes friulensis* DSM7358, fermentativ mindestens acht antibiotisch wirksame

Verbindungen der Formel I sowohl vom Amphomycin- als auch vom Asparagin-Typ. Am Beispiel der Lipopeptide A1437-C und A1437-D (beides Verbindungen der Formel II) soll gezeigt werden, durch welche Maßnahmen sich die Ausbeuten an Lipopeptiden vom Asparagin-Typ wesentlich erhöhen lassen.

A1437-C und A1437-D sind zyklische Dekapeptide mit einem exozyklischen Asparagin, das im Fall des C-Peptids mit einer C13- und im Fall des D-Peptids mit einer C14-Fettsäure acyliert ist (Fig. 2). Durch Fütterung mit den Aminosäuren Valin bzw. Leucin, die als Starter für die Synthese der jeweiligen Fettsäure dienen, kann die Fermentation in Richtung C- bzw. D-Peptidbildung gesteuert werden. Allerdings werden stets gleichzeitig mit dem C-Peptid ein sog. A-Peptid (A1437-A) und mit dem D-Peptid das B-Peptid (A1437-B) gebildet, das sich vom C- bzw. D-Peptid nur in der exozyklischen Position (Asparaginsäure statt Asparagin) unterscheidet. In der Regel liegen die Titer dieser Peptide sogar noch höher als die des C- und D-Peptids; im günstigsten Fall beträgt das Verhältnis ca. 1:1. Typischerweise bewegten sich die Ausbeuten in der Schüttelkultur zwischen 40 - 150 mg/l D-Peptid bei 50 - 250 mg/l B-Peptid (Beispiel 1). In 30 l und 200 l-Stahlfermentern konnten typischerweise 800 - 1100 mg/l B-Peptid bei 20 - 40 mg/l D-Peptid erzielt werden (Beispiel 2).

Mögliche Ursachen für die in Fermentern reduzierten Ausbeuten an A1437-D sind zum einen mögliche negative Einflüsse von Metallionen, die durch Abrieb vom Fermenter in die Kulturlösung gelangen sowie die erhöhte Biomassebildung, die zu einem relativen Mangel an Asparagin führt. Um diese Möglichkeiten näher zu untersuchen, wurde die Kulturlösung mit EDTA (0.5 mM) und Zitronensäure (10 mM) als Ionenfänger sowie mit Asparagin (0.5 g/l) supplementiert. Hierbei zeigte sich, daß im Stahlfermenter nicht nur die Schüttelkulturausbeute erreicht werden konnte, sondern überraschenderweise auch signifikant übertroffen und das D-Peptid (A1437-D) die prävalente Komponente wurde. Die maximalen Ausbeuten betrugen z.B. 1.2 g/l A1437-D bei 280 mg/l A1437-B (Beispiel 2). Die selektive Verlagerung und Steigerung der Ausbeute in Richtung A1437-D konnte ebenfalls in Schüttelkultur beobachtet

25

werden. Die Ausbeute an A1437-D konnte in Schüttelkultur bei gleicher durchschnittlicher Ausbeute an A1437-B auf ebenfalls 1 g/l gesteigert werden (Beispiel 1).

Beispiel 1

Erhöhung der Ausbeuten an A1437-D mit *Actinoplanes friulensis* DSM 7358 in Schüttelkultur durch Zugabe von EDTA und Asparagin

Ein 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml einer Nährlösung (NL 1) folgender Zusammensetzung

NL 1:	30	g/l	Saccharose	
	2	g/l	KNO ₃	
	1	g/l	K ₂ HPO ₄	
	0,5	g/l	MgSO ₄ * 7H ₂ O	
	0,5	g/l	KCl	
	0,01	g/l	FeSO ₄ * 7H ₂ O	
	2	g/l	Hefeextrakt	
	5	g/l	Caseinpepton	pH 7.3

wird mit einer Ampulle (3 ml Füllmenge) Myzel, das bei -190 °C in flüssigem Stickstoff gelagert war, beimpft und für 5 Tage bei 28 °C und 240 Upm geschüttelt.

✓ Mit 25 ml dieses Kolbens wird ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der mit 500 ml der folgenden Nährlösung (NL 2) gefüllt ist, beimpft.

NL 2:	11	g/l	Saccharose	
	6	g/l	Fleischextrakt Merck	
	0,3	g/l	Hefeextrakt	
	0,6	g/l	MgSO ₄ * 7H ₂ O	
	0,1	g/l	KH ₂ PO ₄	
	3,9	g/l	L-Valin	
	0,0027	g/l	FeCl ₃ * 6H ₂ O	pH 7,2

Der pH-Wert der Fermentationsbrühe beträgt am Ende der Fermentation 7,0 bis 7,8.
Typischerweise lagen die Ausbeuten zwischen 20 und 155 mg/l A1437-D bei 60 -250 mg/l A1437-B.

Einzelergebnisse

		A1437-B	A1437-D
		mg/l	mg/l
Kolben	1	140	85
	2	180	140
	3	240	155
	4	110	130
	5	90	20
	6	60	40

Durch Zugabe von 0,5 mM Ethylen-diamino-tetraessigsäure (EDTA) und 0.5 g/l Asparagin konnten die Ausbeuten an A1437-D auf ca. 1 g/l bei gleicher durchschnittlicher Ausbeute an A1437-B gesteigert werden.

Einzelergebnisse

		A1437-B	A1437-D
		mg/l	mg/l
Kolben	1	170	860
	2	70	500
	3	200	980
	4	130	510
	5	65	420
	6	190	780

Beispiel 2

Erhöhung der Ausbeuten an A1437-D durch Fermentation von *Actinoplanes friulensis* DSM 7358 in 200 l-Fermentern durch Zugabe von EDTA und Asparagin.

Ein 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml der Nährlösung 1 wird mit dem Inhalt einer bei -190°C gelagerten Ampulle beimpft und für 5 Tage bei 28°C und 240 Upm geschüttelt.

20 ml dieses Kolbens wurden auf einen mit 500 ml derselben Nährlösung gefüllten 2l-Erlenmeyerkolben verimpft, der für ebenfalls 5 Tage bei 28°C und 120 Upm geschüttelt wird.

Der Inhalt von 8 dieser Kolben wird auf einen 40 l-Fermenter verimpft, der mit 30 l der Nährlösung 2 gefüllt ist und für 150 - 250 h bei 28°C, 0,7 vvm und einer Rührergeschwindigkeit von 0,8 m/sec gefahren wird. Der pH-Wert der Fermentationsbrühe beträgt am Ende der Fermentation 7,0 bis 7,8.

Die Ausbeuten liegen typischerweise zwischen 20 und 40 mg/l A1437-D bei einer A1437-B-Konzentration von 800 - 1000 mg/l.

Einzelergebnisse

		A1437-B mg/l	A1437-D mg/l
Fermenter	1	830	20
	2	730	40
	3	1050	40

Durch Zugabe von 0,5 mM EDTA und 0,5 g/l Asparagin konnten die A1437-D-Ausbeuten auf bis zu 1,2 g/l bei erheblicher Reduzierung der A1437-B-Konzentration erhöht werden.

Einzelergebnisse

		A1437-B mg/l	A1437-D mg/l
Fermenter	1	220	690
	2	140	930
	3	430	1200

Beispiel 3

Ausbeuten an A1437-C durch Fermentation von *Actinoplanes friulensis* DSM 7358 in Schüttelkultur.

Ein 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml der Nährlösung 1 wird mit dem Inhalt einer bei -190 °C gelagerten Ampulle beimpft und für 5 Tage bei 28 °C und 240 Upm geschüttelt.

Mit 25 ml dieses Kolbens wird ein 2 l-Erlenmeyerkolben, der mit 500 ml der folgenden Nährlösung (NL 3) gefüllt ist, beimpft.

NL 3:	11	g/l	Saccharose	
	6	g/l	Fleischextrakt	
	0,3	g/l	Hefeextrakt	
	0,6	g/l	MgSO ₄ * 7H ₂ O	
	0,1	g/l	KH ₂ PO ₄	
	3,9	g/l	L-Leucin	
	0,0027	g/l		FeSO ₄ * 7H ₂ O pH 7.3

Der pH-Wert der Fermentationsbrühe beträgt am Ende der Fermentation 7,0 bis 7,8.
Die Ausbeuten betragen typischerweise:

		A1437-A mg/l	A1437-C mg/l
Kolben	1	166	298
	2	543	168
	3	518	173
	4	435	210
	5	345	230
	6	225	215

Beispiel 4

Tabelle 2 gibt einen Stabilitäts-Vergleich von dem A 1437 D - Natrium-Salz mit dem Calcium-Mischsalz, C₅₉H₉₂N₁₄O₁₉Ca₂I₂, nach Lagerung bei 40° C wieder.

Abbaurrate des A 1437 D, in %.

A 1437-D-Natriumsalz,

3 %

C₅₉H₉₂N₁₄O₁₉Ca₂I₂ :

< 0,5 %

31

Keim	Resistenz*	MHK-Werte ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
Enteroc. faecium, HM3	teiR, vanR, eryR	0.6
Enteroc. gallinarium, HM8	vanR, tetR	0.15
Enteroc. faecalis, HM9	novR, vanR, eryR	2.5
Enteroc. faecalis, UC5	ATCC 29212 novR	2.5
Enteroc. faecalis, DU18	tetR, novR	0.6

* S = empfindlich, R = resistent, ery = Erythromycin, nov = Novobiocin,
 ofl = Ofloxacin, oxa = Oxacillin, rif = Rifampicin, tei = Teichoplanin,
 tet = Tetracyclin, van = Vancomycin.

Beispiel 6

Herstellung des A 1437 D-dicalcium-jodid-Salzes ($\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{I}_2$).

Zu einer Lösung von 1.35 g A 1437 D - Natriumsalz in 27 ml absol. Ethanol werden langsam 0.8 g $\text{CaI}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, gelöst in 3 ml Ethanol, gegeben. Hierbei fällt allmählich ein weißer, flockiger Niederschlag aus, der nach 30 Minuten durch Zentrifugieren gesammelt, dreimal mit je 10 ml kaltem Ethylalkohol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet wird. Es resultieren 1.4 g A 1437 D-dicalcium-jodid-Salz. Die Analysen ergeben neben 79% A 1437D, welches durch HPLC bestimmt wird, 5% Ca, 15.4% Jod und < 0.2% Natrium, entsprechend der Zusammensetzung $\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{Ca}_2\text{I}_2$.

Beispiel 7

Herstellung des A 1437 D-calcium-bromid-Salzes.

18 g A 1437 D - Natriumsalz werden in 360 ml absol. Ethanol gelöst und bei Zimmertemperatur mit 7 g CaBr_2 , gelöst in wasserfreiem Ethanol, versetzt. Es fällt hierbei ein weißer, flockiger Niederschlag aus, der durch Zentrifugieren 15 Minuten bei

Beispiel 5

Die antibakterielle Wirkung des A 1437 D - Ca-Salzes ist in der Tabelle 3 zusammengefaßt. Der Wert der Verbindung ist in ihrer Wirksamkeit gegen die resistenten und multiresistenten Krankheitserreger begründet: das Wirkungsspektrum macht das Antibiotikum - neben der unten aufgeführten guten Verträglichkeit - zu einer Bereicherung des Arzneimittelschatzes.

Tabelle 3: In-Vitro Aktivität des A 1437 D - Ca-Salzes gegen grampositive Bakterien im Reihenverdünnungstest angegeben als minimale Hemm-Konzentration (MHK).

Keim	Resistenz*	MHK-Werte ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
Staphyloc. aureus, 11HT3	S	0.04
Staph. aureus,	ATCC 13709 ,	0.6
Staph. aureus, 11HT1	novR	0.15
Staph. aureus, 11DU5	novR, tetR	0.08
Staph. aureus, 11CB20	oxaR, eryR, tetR	0.6
Staph. aureus, 11GO64	oflR, oxaR, eryR, novR	0.6
Staphyloc. coagul. negativ oflR,	oxaR, tetR	0.3
Staph. epidermidis, GO20	tetR	0.3
Staph. epidermidis, GO42	oxaR	0.3
Streptoc. pyogenes, A1SJ1	eryR	0.6
Streptoc. pyogenes, A1FI6	eryR	0.6
Streptoc. gr. G, G0CB2	tetR, rifR, novR	0.3
Streptoc. pneumoniae 30BI2	eryR	0.3
Streptoc. milleri, GR12	S	0.3
Streptoc. mitis, GR16	eryR	0.6
Enteroc. faecium, AP9	vanR, teiR	0.6
Enteroc. faecium, HT12	teiR, vanR, eryR, tetR	0.6
Enteroc. faecium, IP2	teiR, vanR, eryR, tetR	0.6

8000 g gesammelt wird. Zweimaliges Waschen mit je 180 ml absol. Ethanol und anschließendes Trocknen im Vakuum führt zu 18.8 g A 1437 D-calcium-bromid-Salz, dessen Analyse 80% A 1437 D (HPLC, als freie Säure), 6% Calcium, 15 % Brom und < 0.1% Natrium ergibt.

Beispiel 8

Herstellung des A 1437 D-Monocalciumsalzes durch Festphasen-Extraktion.

1,1 g A 1437 D-calcium-bromid-Salz hergestellt entsprechend Beispiel 7 werden in Wasser gelöst und auf eine vorbereitete, 16 ml fassende, mit MCI Gel CHP20P, 75-150 μ gefüllte Säule aufgetragen. Eluiert wird, so rasch es geht, mit einem Lösungsmittel-Gradienten von 10% Methanol in Wasser (Lösung A) bis 90% Methanol und 10% Butanol (Lösung B). Es werden zuerst die Verunreinigungen von der Säule gewaschen, dann mit reiner Lösung B das A 1437 D-Monocalciumsalz. Konzentrieren im Vakuum ergeben 0.8 g A 1437 D-Monocalciumsalz mit 96% A 1437 D (HPLC) sowie 3% Calcium, entsprechend der Zusammensetzung $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$.

Beispiel 9

Umfällen des A 1437 D-calcium-bromid-Salzes.

1 g A 1437 D-Calciumbromid-Salz, gewonnen wie im Beispiel 7 beschrieben, wird in 100 ml Wasser gelöst und mit 36 ml einer Mischung von Methanol-Butanol (9:1) versetzt. Die zuerst klare Lösung wird allmählich trüb, sie wird zur Vervollständigung 12 Stunden stehengelassen. Durch Zentrifugieren wird der entstandene Niederschlag gesammelt, mit 50 ml kaltem 40%-igem Methanol in Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es werden 720 mg Monocalciumsalz, $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$, erhalten mit 3.1 % Calcium, < 1% Brom und 95% A 1437 D-Monocalciumsalzes.

Beispiel 10

Gewinnung des A 1437 D-Monocalciumsalzes ($C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$) durch Methanol-Fällung.

1 g A 1437 D - Natriumsalz werden in 30 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 200 mg $CaCl_2$ in 10 ml Wasser versetzt. Zur klaren wässrigen Lösung werden 14 ml einer Mischung von 90% Methanol und 10% Butanol gegeben und nach einer Stunde bei 4° C abzentrifugiert. Der zweimal mit je 30 ml wässrigem Methanol (40%) gewaschene Niederschlag ergibt 810 mg A 1437 D-Monocalciumsalz mit 3.2% Calcium, < 1% Chlorid und 94,5% A 1437 D-Monocalciumsalz, berechnet als freie Säure.

Beispiel 11

Bestimmung der in-vitro Hämolyse.

Zur Messung hämolytischen Aktivität wird frisch entnommenes, venöses Blut von Mensch, Rhesusaffen oder Beaglehund verwendet. Das Blut wird in heparinisierten Röhrchen gesammelt und in Aliquots von 200 µl auf 12 Ployethylenröhrchen verteilt. Ein Aliquot wird mit 200 µl destilliertem Wasser versetzt und dient als 100 % Standard, ein anderes wird mit 200 µl physiologischer Kochsalzlösung (0.9 % NaCl) gemischt (0% Standard). Je 200 µl von Substanzverdünnungen in physiologischer Kochsalzlösung zu 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 und 3.125 mg/l werden auf die übrigen Röhrchen verteilt. Sämtliche Röhrchen werden vorsichtig geschwenkt und dann für 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wird der 100 % Standard mit 5 ml destilliertem Wasser, die übrigen Röhrchen mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert.

Die Hämolyse wird durch Messung der Absorbtion des Überstandes in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Die Absorption des Standards mit kompletter Hämolyse wird als 100 % gesetzt. Die Absorption der

Testpräparatverdünnungen und des 0 % Standards werden gemessen und als Prozent der maximal induzierbaren Hämolyse angegeben. Die Tabelle 4 zeigt das Ergebnis des Hämolyseversuchs mit A 1437-B, A 1437-G im Vergleich zu A1437-D Ca-Salz, durchgeführt mit Affenblut.

Die Tabelle 4 zeigt beispielhaft die in vitro Hämolyse von Affenblut in Abhängigkeit von den Antibiotika-Konzentrationen.

Tabelle 4

	Antibiotika-Konzentrationen (mg / l):							
	12,5	25	50	100	200	400	800	1600
A 1437-B	0	2	7	11	16	25	31	39
A 1437-G	0	5	8	12	17	25	30	40
A1437-D Ca-Salz	0	0	0	3	6	9	15	19

Beispiel 12

Herstellung des A 1437 D-dicalcium-dichlorid-Salzes aus dem Natrium-Salz.

15 g A 1437 D-Natriumsalz werden in 400 ml absolutem Ethanol vollständig gelöst und mit 2,52 CaCl₂ (trocken), gelöst in 100 ml absolutem Ethanol, unter langsamem Rühren während 30 Minuten versetzt und anschließend zwei Stunden bei 0 °C stehen gelassen. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt, mit 200 ml Ethanol

gewaschen, erneut abzentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet. Die Ausbeute beträgt 16,5 g. Das Endprodukt enthält 80.5% A 1437 D-Lipopeptid, berechnet als freie Säure, 4.5% Wasser, 5.1% Calcium, 7.5% Chlorid und 2.1% Natrium entsprechend der Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca_2Cl_2$ mit einer Beimengung von ca. 4.6% NaCl.

Beispiel 13

Kristallisation des A 1437 D-dicalcium-dichlorid-Salzes aus dem Natrium-Salz.

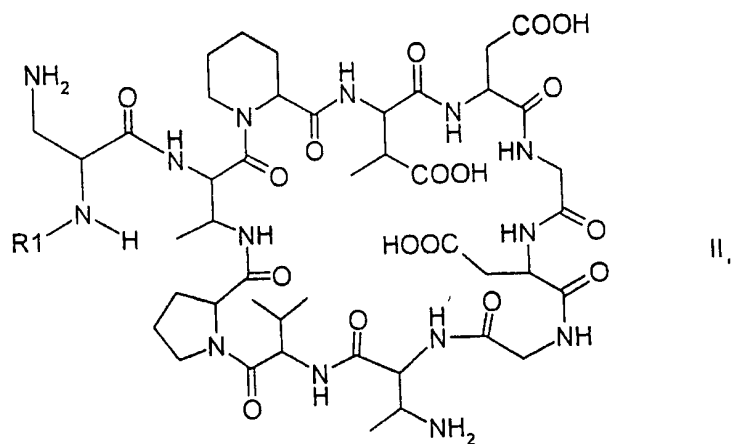
2,5 g A 1437 D-Natriumsalz, Reinheit: 91,9%, werden in 100 ml Wasser gelöst, mit 10 g $CaCl_2$ (z. B. Aldrich Cat. No.: 38,314-7) versetzt. Falls hierbei eine Trübung auftritt, wird diese durch Filtration oder durch Zentrifugieren entfernt. Nun wird die Kristallisation durch Zugabe von 35 ml Ethanol im Verlauf von zwei Stunden langsam ausgelöst, wobei bei einem organischen Lösungsmittel-Anteil von 15 % die Kristallbildung allmählich einsetzt. Zur Beschleunigung der Kristallisation kann der Ansatz bei einem Lösungsmittelanteil von 20 % angeimpft werden. Nach beendeter Lösungsmittel-Zugabe läßt man die kristalline Suspension 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen, wobei ein gelegentliches Umrühren die Kristallbildung beschleunigt. Zur Vervollständigung der Kristallisation wird der Ansatz über Nacht auf $+1^\circ C$ gekühlt und anschließend abgenutscht. Das aus dichtem Nadelbüscheln bestehende Kristallisat wird mit 5 ml einer kalten Mischung von 25 % Ethanol in Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Es werden 22 g A 1437 D-Dicalciumdichlorid-Salz, entsprechend 81 % Ausbeute, in 97,9 %-iger Reinheit gewonnen. Die Mutterlauge (5 g organischer Feststoff, mit etwa 63 %-iger Reinheit) wird gekühlt stehen gelassen, wobei im Laufe von mehreren Tagen noch weiteres A 1437 D-Dicalciumdichlorid-Salz auskristallisiert.

Beispiel 14**Herstellung einer A 1437 D – Dicalciumdichlorid-Injektionslösung**

100 mg A 1437 D-Dicalciumdichlorid und 100 mg apyrogenes Mannit werden in 2 ml sterilem Wasser gelöst und lyophilisiert. Das gesamte Lyophilisat, das als Pulver vorliegt, wird in 2 ml Wasser für Injektionslösungen gelöst, in eine sterilisierte Ampulle gefüllt und die Ampulle mit einem Septum verschlossen.

Patentansprüche

1. Ein Calciumsalz der Verbindung der Formel II

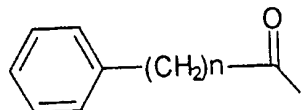


worin R1 ein geradkettiger oder verzweigter, gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Acylrest mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen bedeutet, der wahlweise durch ein oder mehrere Phenyl- oder Cycloalkylgruppen unterbrochen oder mit solchen Gruppen verknüpft und ferner wahlweise durch Sauerstoff unterbrochen sein kann.

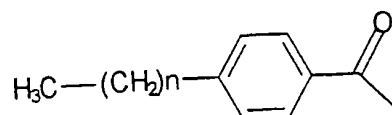
2. Calciumsalz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R1 ein durch eine Phenyl- oder Cycloalkylgruppe unterbrochener oder mit einer solchen Gruppe verknüpfter Acylrest bedeutet.
3. Calciumsalz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R1

38

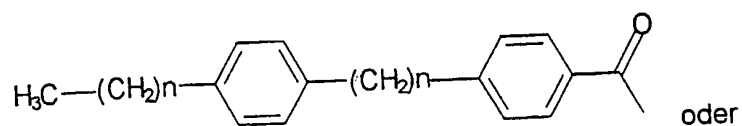
(a)



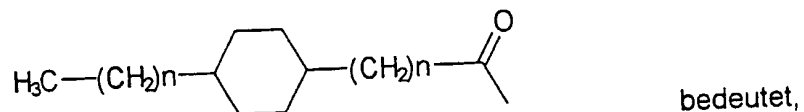
(b)



(c)



(d)



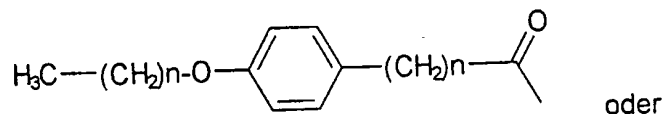
wobei n eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

4. Calciumsalz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R_1 ein durch eine Phenyl- oder Cycloalkylgruppe und durch Sauerstoff unterbrochener Acylrest bedeutet.

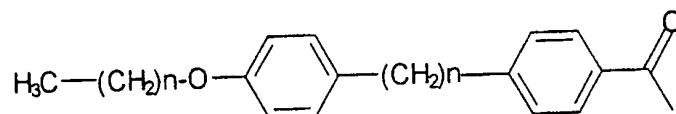
5. Calciumsalz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß R_1

39

(a)



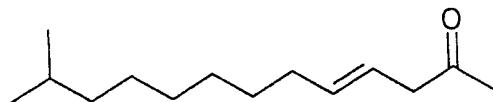
(b)



bedeutet, wobei n eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist.

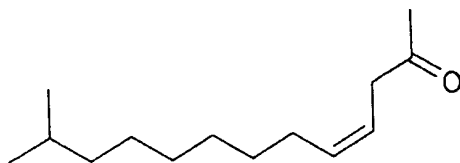
6. Calciumsalz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R1 ein geradkettiger oder verzweigter, gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Acylrest mit 12 bis 15 Kohlenstoffatomen bedeutet.

7. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



bedeutet.

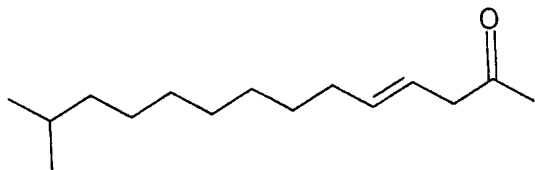
8. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



bedeutet.

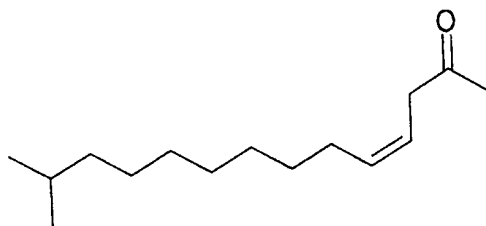
9. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1

40



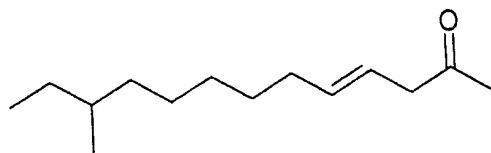
bedeutet.

10. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



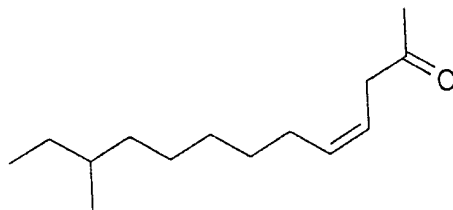
bedeutet.

11. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



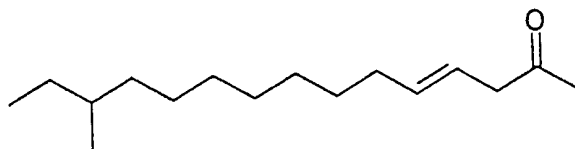
bedeutet.

12. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



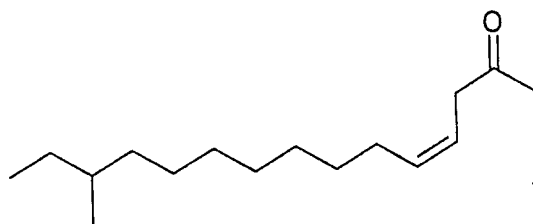
bedeutet.

13. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



bedeutet.

14. Calciumsalz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß R1



bedeutet.

15. Calciumsalz nach Anspruch 1 oder 6, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{68+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_2$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.

16. Calciumsalz nach Anspruch 1 oder 6, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{69+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_3$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.

17. Calciumsalz nach Anspruch 1 oder 6, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{70+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_4$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.

18. Calciumsalz nach einem oder mehreren der Ansprüche 1, 6 und 7 bis 14, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{66+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_2$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.
19. Calciumsalz nach einem oder mehreren der Ansprüche 1, 6 und 7 bis 14, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{67+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_3$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.
20. Calciumsalz nach einem oder mehreren der Ansprüche 1, 6 und 7 bis 14, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{68+2n}N_{14}O_{19}Ca_2X_4$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 und X ein Anion bedeuten.
21. Calciumsalz nach Anspruch 9 oder 10, ferner gekennzeichnet durch die Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca_2X_2$, worin X ein Anion bedeutet.
22. Calciumsalz nach Anspruch 9 oder 10, ferner gekennzeichnet durch die Summenformel $C_{59}H_{93}N_{14}O_{19}Ca_2X_3$, worin X ein Anion bedeutet.
23. Calciumsalz nach Anspruch 9 oder 10, ferner gekennzeichnet durch die Summenformel $C_{59}H_{94}N_{14}O_{19}Ca_2X_4$, worin X ein Anion bedeutet.
24. Calciumsalz nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß X Cl^- , Br^- oder I^- bedeutet.
25. Calciumsalz nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß X Cl^- bedeutet.
26. Calciumsalz nach Anspruch 1 oder 6, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{68+2n}N_{14}O_{19}Ca$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 bedeutet.

27. Calciumsalz nach einem oder mehreren der Ansprüche 1, 6 und 7 bis 14, ferner gekennzeichnet durch die allgemeine Summenformel $C_{46+n}H_{66+2n}N_{14}O_{19}Ca$, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 21 bedeutet.
28. Calciumsalz nach Anspruch 9 oder 10, ferner gekennzeichnet durch die Summenformel $C_{59}H_{92}N_{14}O_{19}Ca$.
29. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet daß man ein Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 in einem geeignetem organischen Lösungsmittel löst, zu dieser Lösung ein in Ethanol gelöstes Calciumsalz hinzufügt und das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 25 als Niederschlag isoliert.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das geeignete organische Lösungsmittel Ethanol ist.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, daß man ein in Ethanol gelöstes Calciumhalogenid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe $CaCl_2$, $CaBr_2$, CaJ_2 und deren Hydrate, hinzufügt.
32. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet daß man ein Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 25 in einem polaren Lösungsmittel löst, anschließend die erhaltene Lösung mit einem weniger polaren Lösungsmittel oder einer Mischung aus weniger polaren Lösungsmitteln versetzt und das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 26 bis 28 als Niederschlag isoliert.
33. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 und 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet daß man ein Natrium- oder

Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 in einem polaren Lösungsmittel löst, zu dieser Lösung ein in demselben Lösungsmittel gelöstes Calciumsalz hinzufügt, anschließend die erhaltene Lösung mit einem weniger polaren Lösungsmittel oder einer weniger polaren Lösungsmittelmischung versetzt und das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 und 26 bis 28 als Niederschlag isoliert.

34. Verfahren nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß das Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II oder das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 25 in einem polaren Lösungsmittel gelöst wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe Wasser, Dimethylsulfoxid und Methanol.

35. Verfahren nach Anspruch 32, 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß das weniger polare Lösungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe Alkohole, Aceton und Acetonitril.

36. Verfahren nach Anspruch 32 oder einem oder mehreren der Ansprüche 33 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II oder das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 25 in Wasser gelöst wird und das weniger polare Lösungsmittel Methanol ist.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß als weniger polare Lösungsmittelmischung ein Gemisch aus Methanol und Butanol zugesetzt wird.

38. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 und 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Natrium- oder Ammoniumsalz der Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 in Methanol löst, zu dieser Lösung ein in demselben Lösungsmittel gelöstes Calciumsalz hinzufügt, anschließend die erhaltene Lösung mit Wasser oder

einer Mischung aus Wasser und Butanol versetzt und das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 und 26 bis 28 als Niederschlag isoliert.

39. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 33 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß als gelöstes Calciumsalz ein Calciumhalogenid, welches ausgewählt ist aus der Gruppe CaCl_2 , CaBr_2 , CaI_2 und deren Hydrate, hinzugefügt.

40. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wäßrige Lösung eines Natrium- oder Ammoniumsalzes der Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14 mit einem Calciumhalogenid versetzt und man diese Lösung oder wahlweise eine wäßrige Lösung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 25 auf einen Träger, der ausgewählt ist aus der Gruppe der Adsorptionssharze, der Umkehrphasenträger, Molekularsiebe und der Ionenaustauscher, aufträgt und man schließlich das Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 26 bis 28 mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert.

41. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 6 bis 14 durch Fermentation von *Actinoplanes spec.*, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fermentationslösung mit einem oder mehreren Komplexbildnern und mit Asparagin supplementiert.

42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplexbildner Zitronensäure ist.

43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplexbildner EDTA ist.

44. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 41 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentationslösung mit EDTA und Zitronensäure als Komplexbildnern supplementiert wird.
45. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 41 bis 44 zur Herstellung einer Verbindung der Formel II gemäß Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentationslösung ferner mit L-Leucin supplementiert wird.
46. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 41 bis 44 zur Herstellung einer Verbindung der Formel II gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentationslösung ferner mit L-Valin supplementiert wird.
47. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 41 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß *Actinoplanes friulensis* DSM 7358 fermentiert wird.
48. Verfahren zur Herstellung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 6 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst eine Verbindung der Formel II gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 6 bis 14 mit einem Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 41 bis 47 herstellt, die Verbindung der Formel II in das Natrium- oder Ammoniumsalz überführt und schließlich das Calciumsalz mit einem Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 29 bis 40 gewinnt.
49. Calciumsalz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28 zur Verwendung als Arzneimittel.
50. Calciumsalz gemäß Anspruch 25 zur Verwendung als Arzneimittel.
51. Calciumsalz gemäß Anspruch 28 zur Verwendung als Arzneimittel.

52. Verwendung eines Calciumsalzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28 zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen.
53. Verwendung eines Calciumsalzes gemäß Anspruch 25 zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen.
54. Verwendung eines Calciumsalzes gemäß Anspruch 28 zur Herstellung eines Arzneimittels gegen bakterielle Infektionen.
55. Verwendung nach einem der Ansprüche 52 bis 53, dadurch gekennzeichnet, daß die bakteriellen Infektionen von gram-positiven Bakterien hervorgerufen werden.
56. Verwendung nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß die gram-positiven Bakterien glykopeptidresistente Bakterien sind.
57. Arzneimittel enthaltend ein oder mehrere Calciumsalze gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28 und pharmazeutische Hilfsstoffe.
58. Arzneimittel enthaltend mindestens ein Calciumsalz gemäß Anspruch 25 und pharmazeutische Hilfsstoffe.
59. Arzneimittel enthaltend mindestens ein Calciumsalz gemäß Anspruch 28 und pharmazeutische Hilfsstoffe.
60. Injizierbare Lösung enthaltend ein oder mehrere Calciumsalze gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28.
61. Injizierbare Lösung enthaltend mindestens ein Calciumsalz gemäß Anspruch 25.
62. Injizierbare Lösung enthaltend mindestens ein Calciumsalz gemäß Anspruch 28.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 99/00930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER ⁶:

IPC 6 : C07K 7/60, A61K 38/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REG, CAPLUS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0629636 A1 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT), 21 December 1994 (21.12.94).	1-62
A	US 5629288 A (RUDOLF LATTRELL ET AL), 13 May 1997 (13.05.97).	1-62
	-/--	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

• Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 June 1999 (18.06.99)

Date of mailing of the international search report
23 July 1999 (23.07.99)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/06/99

International application No.
PCT/EP 99/00930

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP	0629636	A1	21/12/94	AT 174604 T	15/01/99
				AU 672691 B	10/10/96
				AU 6462094 A	15/12/94
				CA 2125376 A	09/12/94
				CZ 9401381 A	15/12/94
				DE 59407475 D	00/00/00
				EP 0864584 A	16/09/98
				ES 2127312 T	16/04/99
				FI 942660 A	09/12/94
				HU 69937 A	28/09/95
				HU 9401465 D	00/00/00
				IL 109917 D	00/00/00
				JP 2660161 B	08/10/97
				JP 7097394 A	11/04/95
				NO 942110 A	09/12/94
				NZ 260682 A	27/11/95
				PL 303716 A	12/12/94
				SK 68594 A	05/01/95
				ZA 9403983 A	27/01/95
US	5629288	A	13/05/97	AU 696566 B	10/09/98
				AU 1611095 A	12/10/95
				CA 2145826 A	01/10/95
				CN 1111640 A	15/11/95
				CZ 9500779 A	18/10/95
				DE 4411025 A	05/10/95
				EP 0688789 A	27/12/95
				FI 951468 A	01/10/95
				HU 71584 A	28/12/95
				IL 113160 D	00/00/00
				JP 7278186 A	24/10/95
				NO 951198 A	02/10/95
				NZ 270828 A	28/10/96
				PL 307914 A	02/10/95
				ZA 9502555 A	21/12/95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00930

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C07K 7/60, A61K 38/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C07K

Recherchte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

REG, CAPLUS, WPI

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0629636 A1 (HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT), 21 Dezember 1994 (21.12.94)	1-62
	--	
A	US 5629288 A (RUDOLF LATTRELL ET AL), 13 Mai 1997 (13.05.97)	1-62
	-- -----	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegend ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18 Juni 1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel(+31-70)340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax(+31-70)340-3018

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23.07.99

Bevollmächtigter Bediensteter

Telefonnr.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00930

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0629636 A1	21/12/94	AT 174604 T	15/01/99
		AU 672691 B	10/10/96
		AU 6462094 A	15/12/94
		CA 2125376 A	09/12/94
		CZ 9401381 A	15/12/94
		DE 59407475 D	00/00/00
		EP 0864584 A	16/09/98
		ES 2127312 T	16/04/99
		FI 942660 A	09/12/94
		HU 69937 A	28/09/95
		HU 9401465 D	00/00/00
		IL 109917 D	00/00/00
		JP 2660161 B	08/10/97
		JP 7097394 A	11/04/95
		NO 942110 A	09/12/94
		NZ 260682 A	27/11/95
		PL 303716 A	12/12/94
		SK 68594 A	05/01/95
		ZA 9403983 A	27/01/95
US 5629288 A	13/05/97	AU 696566 B	10/09/98
		AU 1611095 A	12/10/95
		CA 2145826 A	01/10/95
		CN 1111640 A	15/11/95
		CZ 9500779 A	18/10/95
		DE 4411025 A	05/10/95
		EP 0688789 A	27/12/95
		FI 951468 A	01/10/95
		HU 71584 A	28/12/95
		IL 113160 D	00/00/00
		JP 7278186 A	24/10/95
		NO 951198 A	02/10/95
		NZ 270828 A	28/10/96
		PL 307914 A	02/10/95
		ZA 9502555 A	21/12/95